一步之遥，八年光阴：丙肝病原体的发现到证明之路

范筱斐[1,2]　周　程[1,2*]
1 北京大学 哲学系 北京 100871
2 北京大学 医学人文学院 北京 100191

摘要　2020 年的诺贝尔生理学或医学奖授予了在发现丙肝病毒（HCV）方面作出突出贡献的哈维·阿尔特（Harvey J. Alter）、迈克尔·霍顿（Michael Houghton）和查尔斯·赖斯（Charles M. Rice）。然而，从 1989 年霍顿捕获 HCV 到 1997 年赖斯证明 HCV 能引发肝炎，间隔了 8 年时间。这看似一步之遥的距离何以耗时如此之久？文章通过回顾文献，对这一时期的研究脉络进行了梳理，明确了包括赖斯团队在内的不同研究者对于推进 HCV 相关认识所作的具体贡献。同时，针对研究过程中的两个关键节点——病毒 RNA 基因组3′末端的准确测序和感染性分子克隆的建立，文章从技术储备、路径依赖和目标定位的角度分析了赖斯团队为何能在科学研究竞争中拔得头筹。

关键词　丙肝病毒，cDNA 克隆，科赫原则，科学研究，诺贝尔奖，自然科学史

DOI　10.16418/j.issn.1000-3045.20210131002

2020 年的诺贝尔生理学或医学奖授予了在发现丙肝病毒（HCV）方面作出突出贡献的哈维·阿尔特（Harvey J. Alter）、迈克尔·霍顿（Michael Houghton）和查尔斯·赖斯（Charles M. Rice）。继阿尔特通过实验排除已知病原体，于 1975 年提出非甲非乙型肝炎（NANB）的假说[1]，接着于 1978 年成功地将 NANB 型肝炎传染给黑猩猩[2]之后，霍顿在对相关病原体尚无充分认识的情况下，采用极为巧妙的方法，于 1989 年实现了对该病原体的互补脱氧核糖核酸（cDNA）分子克隆，并将其命名为 HCV[3]。按照科赫原则[4]及其适用于病毒性病原体的修订[5]，如果分离出的 HCV 能够感染健康个体，则可实现逻辑闭环，证明 HCV 与肝炎发病之间存在因果关系。然而这一看似近在咫尺的成果，却直到 1997 年才变为现实[6]。本文拟对这一时期的相关研究进行系统梳理，着重探讨这一步之遥何以耗费了 8 年光阴。

*通信作者
资助项目：国家社会科学基金重大项目（20&ZD075）
修改稿收到日期：2021年2月20日；预出版日期：2021年3月8日

1 早期的HCV分子克隆

在霍顿之前，一些研究根据 NANB 病原体的滤过特性及其与有机溶剂的反应推测该病原体是由脂质包裹的 RNA 病毒[7,8]，且不太可能采用逆转录方式增殖[9]。霍顿分离的 cDNA 克隆就衍生自病毒的 RNA 基因组。该克隆所编码的多肽具有抗原性，能与患者血清中的抗体结合。霍顿通过对 cDNA 克隆的初步分析，发现 HCV 含有单股正链 RNA，长度约 10 000 nt[3]。这些特性表明 HCV 与披膜病毒科（Togaviridae）及刚刚从其中独立出的黄病毒科（Flaviviridae）关系密切。这是人类首次捕获 NANB 病原体的特异性组分，具有里程碑式的意义。

然而，霍顿的 cDNA 克隆并不具有完整的功能，无法在体内实现复制，也不能感染新的宿主。关于这一点，霍顿本人及其团队在后续的文章中都没有正面提到，但是旁证并不少。例如，不少文章认为HCV感染性分子克隆的缺失给相关研究造成了阻碍[10-13]。

感染性分子克隆的缺失可能是序列不完整造成的。一方面，霍顿团队取得突破的 cDNA“克隆 5-1-1”实际只含有 HCV 基因组的一部分，他们甚至需要借助“克隆 81”等其他重叠克隆（overlapping clone）来推测完整序列。另一方面，构建 cDNA 文库，首先需要以 RNA 为模板逆转录生成单链 cDNA，而这一逆转录过程是沿 RNA 的 3′ 端向 5′ 端方向进行的。由于目标 RNA 的序列未知，霍顿只能采用随机引物构建 cDNA 文库，这就极有可能缺失 3′ 末端的起始序列[14]。

虽然感染性缺失的问题没有得到解决，但霍顿团队并未纠结于此——面对 HCV 这片新发掘的“富矿”，手握当时世界上唯一的 HCV 分子克隆，霍顿团队眼前有太多触手可及的成果。为避免在论文发表后失去新颖性，他们在论文见刊的前 1 年将长度达到 7 310 nt 的 HCV 的 RNA 序列（约占整个 HCV 基因组的 70%）申请了欧洲专利[15]。在同刊同期发表的另一篇论文中，他们又从 cDNA 表达产物的抗原性入手，对来自美国、日本和意大利的 NANB 型肝炎患者血清进行了筛查[16]。这项研究不仅为 HCV 诊断工具的开发提供了雏形，还揭示了这 3 个国家 NANB 患者中极高的 HCV 抗体阳性率。学界由此掀起一波筛查 HCV 抗体的热潮。这些研究表明，世界各地输血传播的 NANB 型肝炎[17-20]和社区获得的 NANB 型肝炎[21,22]都与 HCV 感染密切相关。霍顿据此提出 HCV 是导致 NANB 型肝炎的主要病原体[23]。

事实证明，霍顿团队的紧迫感颇有先见之明。20 世纪 80 年代，日本天皇裕仁已进入耄耋之年，伴随身体状况的恶化，极有可能需要手术和输血。出于避免其因输血感染 NANB 型肝炎等目的，日本医学界在肝炎研究方面投入极大，储备了大量技术实力[24]。同时，他们也不忘紧盯美国最先进的研究成果。1988 年底，得益于霍顿团队尚未见刊的血清筛查方法[16]，裕仁天皇成为了世界上第一个接受安全血液制品输血的患者[25]。1990 年，日本国立癌症研究中心（NCCRI）利用霍顿团队公布的 RNA 序列设计寡聚核苷酸引物，通过逆转录-聚合酶链反应（RT-PCR），实现了对几乎整个 HCV 基因组的 cDNA 分子克隆[26]。从此，日本与美国的研究齐头并进，共同引领了对HCV基因组的探索。

2 HCV 基因组的早期探索

2.1 HCV 基因组的基本结构

HCV 基因组的测序工作从一开始就是一场争分夺秒的比拼。如上所述，霍顿团队在 1989 年论文发表前，抢先将已知的序列申请了专利[15]；在 1989 年的论文中，他们又再次强调完整的基因组测序“即将”完成，“很快”会存放到美国国立卫生研究院（NIH）下属国家生物技术信息中心（NCBI）的 GenBank 数据

库中[3]。最终，他们在1991年1月2日提交论文，报告了HCV的基因组序列[27]。

在这一方面，日本的研究则颇有捷足先登之势。由于NCCRI的cDNA克隆几乎涵盖了HCV的整个基因组，其团队在1990年的论文[26]中即已报告了相应的序列，赶在了霍顿团队前面。而大阪大学的研究者甚至等不及获取相对完整的cDNA克隆，就直接利用片段化的重叠克隆拼接出了病毒的基因组序列[28]。后者的研究虽然1991年才见刊，但实际投稿时间比NCCRI[26]还早11天。竞争之激烈可见一斑。

根据上述这些研究，霍顿等[29]于1991年撰写综述，对HCV基因组的结构进行了描述。该综述指出，HCV含有一条长约9 400 nt的单股正链RNA。此RNA的绝大部分序列是一个连续的可读框（ORF）。在此ORF之外，病毒RNA在5′端方向有324—341 nt，包含3—4个小ORF，序列高度保守；在3′端方向则是一段非编码序列，长度只有27—55 nt。除此之外，霍顿团队还报告了一条位于3′末端的多聚腺苷酸片段poly(A)[3,30]。

2.2 HCV的病毒学分类

上文提到，霍顿团队从一开始就注意到了HCV与披膜病毒科和黄病毒科的亲缘关系[3]。紧接着，霍顿团队[31]、大阪大学[28]和美国NIH下属国家过敏和传染病研究所（NIAID）[32]分别开展研究，通过比对基因组翻译产物的氨基酸序列，进一步确认HCV与黄病毒科的黄病毒属（*Flavivirus*）和瘟病毒属（*Pestivirus*）最为接近。1991年，国际病毒分类委员会（ICTV）将其单列为黄病毒科下属的第3个病毒属[33]。

2.3 HCV基因组的异质性

日本学者的工作一方面与霍顿团队取得的结果相互印证，另一方面也揭示出不同来源的HCV基因组存在明显的异质性。

最早注意到这种异质性的是NCCRI的研究者[34]。1989年，他们根据霍顿团队公布的病毒核酸序列设计了多种引物，尝试通过RT-PCR技术对日本患者血浆中的病毒进行扩增，结果发现只有从少数几个序列区域衍生出的引物能够实现成功扩增。这说明衍生自其他区域的引物与日本患者血浆中的病毒模板并不匹配[35]。他们据此推断日本的HCV（HCV-J）基因组与霍顿团队分离的HCV（HCV-US）存在差异。翌年，NCCRI对来自不同患者的HCV-J进行了分析。通过对比其中长度为275 nt的非结构蛋白5（NS5）编码区，他们发现不仅HCV-J与HCV-US存在14%—17%的序列差异，不同的HCV-J之间也存在2.5%—11%的序列差异[36]。这意味着HCV存在不同的基因型。

1991年，日本自治医科大学分离出了区别于HCV-US和HCV-J的第3种HCV毒株[37]；次年，他们将当时已有的7种不同毒株根据其基因组在NS2和包膜蛋白1（E1）编码区的差异分成了4种基因型（四分法）[38]。然而，这种早期分类法同年即被美国NIAID更大规模的研究推翻。该研究在其测序的44种HCV毒株中发现了一些5′端非编码区与上述4种基因型存在显著差异的毒株[39]，这说明四分法的代表性存在问题。他们进一步分析了51种毒株的E1序列，提出至少存在12种不同的HCV基因型[40]。但是，NIAID并没有拿出具有普适性的基因分型标准。

1993年，英国爱丁堡大学与霍顿所供职的英国希龙公司（Chiron Corporation）合作，利用从世界各地采集到的76份病毒样本，对HCV的NS5编码区进行了系统发育分析[41]。根据计算结果，他们将系统进化树中的6个分支列为6种基因型，以阿拉伯数字表示；各个基因型之下再分亚型，以小写英文字母表示。比如，霍顿最初分离的HCV基因型就被命名为1a。这种新的分型方法不仅涵盖了已知的各种基因型，还为潜在的新基因型预留了扩充的可能（第7种基因型发现于2015年[42]），具有极强的代表性，一直沿用至今。

这些早期探索为此后更加深入的研究奠定了基础。

3 HCV 3′ 末端的研究

3.1 研究的缘起

在HCV基因组研究总体上持续取得进展的同时，3′末端研究却陷入了停滞。这是因为临床样本中病毒RNA的含量很低，必须通过体外逆转录及扩增才能进行克隆[6]；而逆转录生成第一链cDNA的过程，须沿模板RNA的3′端向5′端方向进行。这意味着，如果3′末端的起始序列未知，则无法设计相应引物对其进行逆转录和扩增；而不进行逆转录和扩增，反过来又无法开展完整测序。在这样的背景下，已探明的序列在3′端最远只到达某种多聚核苷酸片段，如霍顿团队发现的poly(A)片段[3,30]。霍顿团队虽然没有十足的信心"断言"此poly(A)片段代表了病毒基因组的3′末端序列，但在提及该片段的时候仍然有意无意地将其称为"尾"（tail）[30]。这多少反映出学界倾向于认同病毒基因组3′末端以多聚核苷酸片段结尾这一结论。

尽管如此，还是有两支团队敏锐地发现了问题。他们注意到，只有霍顿团队报告的基因组3′末端是以poly(A)结尾，而其他研究的结果都是以多聚尿苷酸片段poly(U)结尾[26,28,37,43-47]。以此为切入点，日本NCCRI的研究者[48]与美国华盛顿大学（圣路易斯）医学院的赖斯团队[12]几乎同时发起独立研究，采用两种不同的技术路径，分别探明了HCV基因组3′末端的序列。

3.2 日本NCCRI的研究

日本NCCRI取得的突破是利用与HCV基因组RNA互补的负链RNA实现的。

早在1989年，霍顿团队就在其论文[3]中指出，他们通过cDNA克隆捕获的HCV RNA是一条能够直接编码蛋白的正链RNA。参比与其同科的黄病毒属[49]，可推想HCV在其复制过程中不会采用逆转录方式增殖，而是首先需要以此正链RNA为模板生成与其互补的全长负链RNA，之后再以此负链RNA为模板实现正链的增殖。1991年，美国NIH的研究者通过RT-PCR技术首次捕获了HCV的负链RNA，证实了以上猜想[50]。1992年，日本大阪大学的研究者进一步利用此方法对不同组织来源的样本进行了检测，发现只有肝组织样本中存在负链RNA，这说明肝脏是HCV复制的场所[51]。

然而，通过RT-PCR捕捉负链RNA的技术此时并不成熟，特异性很差——即使只加入一种引物（正链或负链），HCV的正、负两链都会出现扩增。针对这一困境，NCCRI于1993年提出假说，指出问题的核心在于目标RNA模板中混入了宿主细胞的RNA片段。这些杂质会在逆转录过程中充当非特异性引物，使非目标链也得到逆转录和扩增。由于实际操作中很难排除这些杂质，研究者决定在逆转录之前，先对底物中所有RNA的3′末端进行化学修饰，使其在逆转录过程中无法充当引物；而后再加入单一引物进行RT-PCR扩增。结果表明，这种方法可以特异性地获得正链或负链的HCV RNA。该研究于1994年发表[52]。

突破这一技术瓶颈之后，NCCRI再接再厉，马上将其用于探索HCV基因组的3′末端序列。HCV基因组3′末端缺失的主要原因在于逆转录生成cDNA的过程存在方向性。HCV负链RNA的发现完美解决了这一问题：负链的碱基序列与正链完全互补，通过负链序列即可推知构成病毒基因组的正链序列；负链的末端方向与正链正好相反，其5′末端序列（对应正链的3′末端）在逆转录过程中能够相对完整地得到保留。

1995年，NCCRI从日本最常见的1b型入手，以患者肝组织样本为原料，使用改良的技术对其中的HCV负链RNA进行RT-PCR扩增。通过对产物的克隆与测序，他们不仅确认了病毒基因组3′末端poly(U)的存在，还发现了某些克隆在poly(U)下游

的其他序列。这种序列最长可达 98 nt。研究者将其命名为 3′ 末端的 X 尾（the 3′ X tail）[48]。这一序列的发现刷新了人们对 HCV 基因组 3′ 末端的认识。

1996 年，NCCRI 继续发表文章[53]，一方面论证了 X 尾确实是 HCV 基因组 3′ 末端最下游的序列，另一方面也揭示出这段高度保守的序列在 HCV 不同基因型中广泛存在，可能在病毒复制中发挥作用。至此，HCV 全基因组序列都已探明。

3.3 查尔斯·赖斯的研究

赖斯出生于 1952 年，1974 年获得动物学学士学位。1975 年，他来到美国加州理工学院，在病毒学家詹姆斯 · 施特劳斯（James Strauss）①的实验室学习生物化学。施特劳斯当时的研究领域主要是 RNA 病毒。在其影响下，赖斯最初的工作是研究披膜病毒科辛德比斯病毒（Sindbis virus）的基因组结构[54]。1981 年获得生物化学博士学位后，赖斯继续留在施特劳斯的实验室从事博士后研究，主要研究当时同属披膜病毒科的黄热病毒（yellow fever virus）。通过对病毒 RNA 的测序，赖斯揭示了黄热病疫苗所使用的毒株（17D）[55]的基因组序列。同时，他还发现黄热病毒与其早前研究的辛德比斯病毒存在明显差异[56]。这一发现推动了以黄热病毒为代表的黄病毒科从披膜病毒科中独立出来，成为一个新的病毒分支。1986 年，赖斯获得了华盛顿大学（圣路易斯）医学院的教职。

1989 年，赖斯利用 17D 株的全长 cDNA 在体外生成了具有感染性的病毒 RNA[57]。他在黄热病领域取得的这项成就，正是在 HCV 领域迟迟没有取得进展的研究。在赖斯取得突破之后，其他研究者相继通过这种制作全长 cDNA 克隆的方法成功获取了黄病毒科黄病毒属[58-61]及瘟病毒属[62-66]其他病毒的感染性 RNA。在这样的背景下，作为黄病毒科的第 3 个病毒属，HCV 的感染性 cDNA 克隆的制备问题变得愈加紧迫。

就在这一时期，赖斯收到了来自美国食品药品监督管理局（FDA）研究员斯蒂芬 · 芬斯通（Stephen Feinstone）的研究邀请。芬斯通一直致力于病毒性肝炎相关研究，也非常欣赏赖斯“摆弄”RNA 病毒的能力。他希望赖斯利用其在黄热病毒基因组方面的专长，在黄热病疫苗毒株的基础上开发丙肝疫苗。考虑到 HCV 与自己之前研究的病毒渊源颇深，赖斯欣然接受了邀请，开始投入到 HCV 的分子生物学研究中[67]。

作为进入该领域后的第一项工作，赖斯首先尝试的是复制之前在黄热病毒研究中取得的成功，为 HCV 制备一个“真正的感染性分子克隆”[6]。他认为准确的测序对于 cDNA 克隆转录的 RNA 感染性的恢复“至关重要”，而在事关病毒复制的 3′ 末端问题上仍然存在的 poly(A) 与 poly(U) 分歧是非常令人“震惊”的[12]。为此，赖斯团队展开了关于病毒基因组 3′ 末端序列的研究。

事实证明，赖斯并没有辜负芬斯通的信任。1996 年，赖斯在 HCV 领域发表的第一篇文章，即报告了包括日本研究者所称 X 尾在内的完整 3′ 末端序列[12]。在这篇研究中，赖斯团队并没有使用负链 RNA，而是设计了一段 3′ 末端阻断（使其 3′ 末端不可延伸）、5′ 末端磷酸化（从而可以连接其他 RNA 的 3′ 末端）的寡核苷酸。他们以含有 HCV（基因型为 1a）的患者血浆为原料，首先将上述寡核苷酸与病毒 RNA 的 3′ 末端连接，将病毒的 RNA 延长；然后利用与寡核苷酸互补的引物将延长后的 RNA 逆转录为 cDNA，再对其进行测序。其结果印证了日本 NCCRI 的相关发现。

虽然此研究涉及的毒株与霍顿团队最初报告的毒株基因型相同，但与其他研究一样，赖斯团队也没有在 3′ 末端发现霍顿团队所说的 poly (A)片段。他们分析，这可能是因为霍顿团队先入为主地认定这一片段

① https://www.bbe.caltech.edu/people/james-h-strauss-jr.

存在，进而强行通过相应的寡聚脱氧胸苷（oligo dT）引物进行逆转录和扩增；而 RT-PCR 技术灵敏度极高，因而抓取到了极少量符合条件的 RNA，但其并不具有代表性。

赖斯团队的研究与日本 NCCRI 的研究虽然是各自独立进行的，但时间上还是有先后。实际上，赖斯团队在撰文的过程中已经注意到了日本学者的研究。他们在文章中如实报告了这一点，并以日本的研究佐证了自己的结果。

这两个研究的发起，直接目的都是为了辨明 HCV 基因组 3′末端到底是 poly(A) 还是 poly(U)；但就其间接目的而言，二者却又不尽相同。与日本学者似乎只关心 3′末端序列这个具体问题不同，赖斯团队的研究从一开始就瞄准了更高的目标，亦即通过建立 HCV 的感染性分子克隆，筛选出可供病毒体外培养的细胞系，进而为包括疫苗在内的后续研究奠定基础[67]。因此，赖斯等在文章中多次提到自己团队尚待发表的成果，处处暗示 3′末端序列的探明只是一个阶段性的成果。这预示着下一个突破已经呼之欲出了。

4 HCV感染性分子克隆的建立

探明 HCV 基因组的 3′末端序列后，赖斯团队随即制备了若干全长的 cDNA 克隆，尝试用这些克隆转录的 RNA 直接感染黑猩猩（除人类以外唯一已知的HCV宿主）。此前，已经有 2 种正链 RNA 病毒——兔出血症病毒（rabbit hemorrhagic disease virus）[68]和甲肝病毒（HAV）[69]，在实验中通过肝内接种RNA的方式成功感染了健康宿主。赖斯团队也采用了这一方法，但是他们首次尝试的 34个 cDNA 克隆（H77 毒株，基因型为 1a）都没有能够引发感染。

为了探查失败原因，赖斯团队从相同的全长 cDNA 组合文库中再次抽取了 6 个克隆进行测序，确定了 H77 毒株基因组的共有序列，亦即各个位点上最典型的碱基组成。他们发现测序的 6 个克隆里每个克隆都与共有序列存在大量差异。除了散发的碱基突变以外，主要的差异有 3 处：在包膜蛋白 2（E2）编码区，有一段序列（HVR1）变异性很高；在基因组的 5′末端，很多克隆比共有序列多了一个或多个碱基；在靠近 3′末端的位置，不同克隆的 poly(U/UC) 片段长度不等（41—133 nt）。赖斯团队认为，正是这些差异导致了肝内接种感染的失败。

基于这些信息，赖斯团队重新设计了符合共有序列的全长 cDNA 克隆，修正了散发的碱基突变。针对三大主要差异，他们在 HVR1 片段用每个位点上占主导地位的共有序列替代了原有的高变异性序列；在 5′末端设计了 5 种序列，包括共有序列及增加了 G/GA/GU/GC 的 4 种序列；在 3′末端设计了 2 种序列，包含全长（133 nt）或中等长度（75 nt）的 poly (U/UC) 片段。通过排列组合，他们制备出 10 个全长的 cDNA 克隆，再次尝试肝内接种其转录的 RNA。结果表明，黑猩猩接种 5′末端采用共有序列、3′末端采用全长 poly(U/UC) 片段的组合后，其血液中能够探测到相应的病毒 RNA，其急性症状体征符合此前研究中关于 H77 毒株感染的描述[70,71]。

至此，赖斯团队证明感染 HCV 病毒“本身”（相对于含有病毒的血浆等样品）即可引发丙肝；HCV 确实是丙肝的病原体。同时，他们在研究中为 1a 基因型的 HCV 建立了具有感染性的分子克隆，从而提供了稳定的、同质化的病毒来源，为后续研究——包括疫苗和药物开发——打下了坚实的基础。

赖斯团队在 1997 年发表的里程碑文章[6]中详细记述了以上从失败到成功的试错过程。在其文章见刊后 1 个月，NIAID 也发表了相似的成果[13]，但终究落后了一步。1999 年，赖斯团队再次发表文章[72]，报告了肝内接种后 60 周的长期随访结果，进一步确证了之前的发现。NIAID 的研究者则继续深入研究，相继主导了 1b[73]和 2a[74]基因型、参与了 3a 和 4a[75]基因型 HCV 感染性分子克隆的建立。

5 结语

2020 年，赖斯与阿尔特、霍顿一道，凭借在 HCV 的发现过程中作出的杰出贡献，分享了当年的诺贝尔生理学或医学奖。瑞典卡罗林斯卡学院的诺贝尔奖大会在颁奖的新闻公告[76]中指出，赖斯获奖的主要贡献在于证明 HCV 病毒本身即可引发肝炎。

赖斯的功绩自然不容置疑，但纵观这一时期的研究脉络，日本 NCCRI 与美国 NIAID 的研究者同样厥功至伟，甚至一度处于领先地位；而且假使没有赖斯的加入，他们实际上也可以完成相应的工作。相对于这两支在 HCV 领域耕耘多年的队伍，“半路出家”的赖斯团队后发而先至，在关键节点上快人一步，最终摘得了诺贝尔奖的桂冠。个中原因，从人的角度来看，或可从以下 3 点进行分析。

（1）技术储备。虽然赖斯并非从一开始就从事 HCV 领域的研究，但其早期的研究领域与 HCV 非常相关。他针对黄热病毒进行的研究，特别是利用全长 cDNA 在体外生成具有感染性的病毒 RNA，对于黄病毒科来说是开创性的工作，这为他后来转战 HCV 领域的相似课题提供了技术储备。

（2）路径依赖。由于在黄热病毒研究中取得的成功，赖斯在面对新的 RNA 病毒（如 HCV）时，很可能形成了一种从“全基因组测序”，到“全长 cDNA”，再到“感染性分子克隆”的路径依赖。虽然路径依赖本身的利弊很难一概而论，但在这个案例中，其作用是积极的。正是由于路径依赖，赖斯节约了大量的决策时间，在新的领域中快速地找到了研究的进路。

（3）目标定位。目标定位也在科学研究的竞争中发挥着关键作用。以本案例中的 3′ 末端问题为例，日本 NCCRI 的团队视之为目的，而赖斯团队则视之为手段。正是因为这种目标定位的不同，一开始落后整整 3 个月（以投稿日期计算）的赖斯团队才能后来居上。

即便如此，我们仍然不得不感叹科学研究中的“时也、运也、命也”——毕竟，从霍顿到赖斯是“一步之遥，八年光阴”，而从其他团队到赖斯团队则是“一步之差，天壤之别”。

从阿尔特提出 NANB 的假说，到霍顿捕获 HCV，再到赖斯证明 HCV 是导致 NANB 型肝炎的病原体，以这 3 人为代表的科学家群体通过共同努力，使得丙肝最终被人类所认知。这为血液检测方法和抗 HCV 靶向药物的研发奠定了基础，也为挽救众多丙肝患者的生命作出了贡献。

参考文献

1 Feinstone S M, Kapikian A Z, Purcell R H, et al. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. New England Journal of Medicine, 1975, 292(15): 767-770.

2 Alter H J, Purcell R H, Holland P V, et al. Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. The Lancet, 1978, 311: 459-463.

3 Choo Q L, Kuo G, Weiner A J, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science, 1989, 244: 359-362.

4 Koch R, Brock T D, Fred E B. The etiology of tuberculosis. Reviews of Infectious Diseases, 1982, 4(6): 1270-1274.

5 Rivers T M. Viruses and Koch's postulates. Journal of Bacteriology, 1937, 33(1): 1-12.

6 Kolykhalov A A, Agapov E V, Blight K J, et al. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. Science, 1997, 277: 570-574.

7 Bradley D W. The agents of non-A, non-B viral hepatitis. Journal of Virological Methods, 1985, 10(4): 307-319.

8 Bradley D W, McCaustland K A, Cook E H, et al. Posttransfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees: Physicochemical evidence that the tubule-forming agent is a small, enveloped virus. Gastroenterology, 1985, 88(3): 773-

779.

9 He L F, Alling D, Popkin T, et al. Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration. The Journal of Infectious Diseases, 1987, 156(4): 636-640.

10 Boyer J C, Haenni A L. Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. Virology, 1994, 198(2): 415-426.

11 Yoo B J, Selby M J, Choe J, et al. Transfection of a differentiated human hepatoma cell line (Huh7) with in vitro-transcribed hepatitis C virus (HCV) RNA and establishment of a long-term culture persistently infected with HCV. Journal of Virology, 1995, 69(1): 32-38.

12 Kolykhalov A A, Feinstone S M, Rice C M. Identification of a highly conserved sequence element at the 3′ *Terminus* of hepatitis C virus genome RNA. Journal of Virology, 1996, 70(6): 3363-3371.

13 Yanagi M, Purcell R H, Emerson S U, et al. Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. PNAS, 1997, 94(16): 8738-8743.

14 Bukh J. The history of hepatitis C virus (HCV): Basic research reveals unique features in phylogeny, evolution and the viral life cycle with new perspectives for epidemic control. Journal of Hepatology, 2016, 65(S1): 2-21.

15 Houghton M, Choo Q-L, Kuo G. NANBV diagnostics and vaccines: European Patent Office, 0318216. 1989-05-31.

16 Kuo G, Choo Q L, Alter H J, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. Science, 1989, 244: 362-364.

17 Alter H J, Purcell R H, Shih J W, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. New England Journal of Medicine, 1989, 321(22): 1494-1500.

18 Esteban J I, Viladomiu L, Gonzalez A, et al. Hepatitis c virus antibodies among risk groups in Spain. The Lancet, 1989, 334: 294-297.

19 van der Poel C L, Lelie P N, Choo Q L, et al. Anti-hepatitis C antibodies and non-A, non-B post-transfusion hepatitis in the Netherlands. The Lancet, 1989, 334: 297-298.

20 Miyamura T, Saito I, Katayama T, et al. Detection of antibody against antigen expressed by molecularly cloned hepatitis C virus cDNA: Application to diagnosis and blood screening for posttransfusion hepatitis. PNAS, 1990, 87(3): 983-987.

21 Alter M J, Hadler S C, Judson F N, et al. Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. Journal of the American Medical Association, 1990, 264(17): 2231-2235.

22 Hopf U, Möller B, Küther D, et al. Long-term follow-up of posttransfusion and sporadic chronic hepatitis non-A, non-B and frequency of circulating antibodies to hepatitis C virus (HCV). Journal of Hepatology, 1990, 10(1): 69-76.

23 Choo Q L, Weiner A J, Overby L R, et al. Hepatitis C virus: The major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. British Medical Bulletin, 1990, 46(2): 423-441.

24 飯野四郎. 肝炎の歴史と現在の治療. (2003-07-01) [2021-1-28]. http://www.mers.jp/events/newsletter-5/mers-events2003.

25 Ledford H. The unsung heroes of the Nobel-winning hepatitis C discovery. Nature, 2020, 586: 485.

26 Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, et al. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. PNAS, 1990, 87(24): 9524-9528.

27 Choo Q L, Richman K H, Han J H, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. PNAS, 1991, 88(6): 2451-2455.

28 Takamizawa A, Mori C, Fuke I, et al. Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. Journal of Virology, 1991, 65(3): 1105-1113.

29 Houghton M, Weiner A, Han J, et al. Molecular biology of the

hepatitis C viruses: Implications for diagnosis, development and control of viral disease. Hepatology, 1991, 14(2): 381-388.

30 Han J H, Shyamala V, Richman K H, et al. Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: Identification of conserved sequences in the 5′ untranslated region and poly(A) tails at the 3′ end. PNAS, 1991, 88(5): 1711-1715.

31 Choo Q-L, Han J, Weiner A J, et al. Hepatitis C virus is a distant relative of the flaviviruses and pestiviruses// Viral Hepatitis C, D, and E: Proceedings of the International Meeting on Non-A, Non-B, Hepatitis, Tokyo, 27-30 September 1989. Amsterdam: Excerpta Medica, 1991: 47-52.

32 Miller R H, Purcell R H. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. PNAS, 1990, 87(6): 2057-2061.

33 Francki R I B, Fauquet C M, Knudson D L. Classification and Nomenclature of Viruses. New York: International Committee on Taxonomy of Viruses, 1991.

34 Kato N, Ohkoshi S, Shimotohno K. Japanese isolates of the non-A, non-B hepatitis viral genome show sequence variations from the original isolate in the USA. Proceedings of the Japan Academy, Series B: Physical and Biological Sciences, 1989, 65(9): 219-223.

35 Sommer R, Tautz D. Minimal homology requirements for PCR primers. Nucleic Acids Research, 1989, 17(16): 6749-6749.

36 Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, et al. Sequence diversity of hepatitis C viral genomes. Molecular Biology & Medicine, 1990, 7(6): 495-501.

37 Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, et al. Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier: Comparison with reported isolates for conserved and divergent regions. The Journal of General Virology, 1991, 72(11): 2697-2704.

38 Okamoto H, Kurai K, Okada S, et al. Full-length sequence of a hepatitis C virus genome having poor homology to reported isolates: Comparative study of four distinct genotypes. Virology, 1992, 188(1): 331-341.

39 Bukh J, Purcell R H, Miller R H. Sequence analysis of the 5’ noncoding region of hepatitis C virus. PNAS, 1992, 89(11): 4942-4946.

40 Bukh J, Purcell R H, Miller R H. At least 12 genotypes of hepatitis C virus predicted by sequence analysis of the putative E1 gene of isolates collected worldwide. PNAS, 1993, 90(17): 8234-8238.

41 Simmonds P, Holmes E C, Cha T A, et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. The Journal of General Virology, 1993, 74(11): 2391-2399.

42 Murphy D G, Sablon E, Chamberland J, et al. Hepatitis C virus genotype 7, a new genotype originating from central Africa. Journal of Clinical Microbiology, 2015, 53(3): 967-972.

43 Chayama K, Tsubota A, Koida I, et al. Nucleotide sequence of hepatitis C virus (type 3b) isolated from a Japanese patient with chronic hepatitis C. Journal of General Virology, 1994, 75(12): 3623-3628.

44 Chen P J, Lin M H, Tai K F, et al. The Taiwanese hepatitis C virus genome: Sequence determination and mapping the 5′ termini of viral genomic and antigenomic RNA. Virology, 1992, 188(1): 102-113.

45 Torahiko T, Nobuyuki K, Masanori N, et al. Molecular cloning of hepatitis C virus genome from a single Japanese carrier: Sequence variation within the same individual and among infected individuals. Virus Research, 1992, 23(1): 39-53.

46 Muerhoff A S, Leary T P, Simons J N, et al. Genomic organization of GB viruses A and B: Two new members of the Flaviviridae associated with GB agent hepatitis. Journal of Virology, 1995, 69(9): 5621-5630.

47 Hayashi N, Higashi H, Kaminaka K, et al. Molecular cloning

and heterogeneity of the human hepatitis C virus (HCV) genome. Journal of Hepatology, 1993, 17(3): S94-S107.

48 Tanaka T, Kato N, Cho M J, et al. A novel sequence found at the 3′-*Terminus* of hepatitis C virus genome. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1995, 215(2): 744-749.

49 Cleaves G R, Ryan T E, Schlesinger R W. Identification and characterization of type 2 dengue virus replicative intermediate and replicative form RNAs. Virology, 1981, 111(1): 73-83.

50 Fong T L, Shindo M, Feinstone S M, et al. Detection of replicative intermediates of hepatitis C viral RNA in liver and serum of patients with chronic hepatitis C. Journal of Clinical Investigation, 1991, 88(3): 1058-1060.

51 Takehara T, Hayashi N, Mita E J, et al. Detection of the minus strand of hepatitis C virus RNA by reverse transcription and polymerase chain reaction: Implications for hepatitis C virus replication in infected tissue. Hepatology, 1992, 15(3): 387-390.

52 Gunji T, Kato N, Hijikata M, et al. Specific detection of positive and negative stranded hepatitis C viral RNA using chemical RNA modification. Archives of Virology, 1994, 134(3): 293-302.

53 Tanaka T, Kato N, Cho M J, et al. Structure of the 3′ *Terminus* of the hepatitis C virus genome. Journal of Virology, 1996, 70(5): 3307-3312.

54 Rice C M, Strauss J H. Nucleotide sequence of the 26S mRNA of Sindbis virus and deduced sequence of the encoded virus structural proteins. PNAS, 1981, 78(4): 2062-2066.

55 Smithburn K C, Durieux C, Koerber R, et al. Yellow Fever Vaccination. Geneva: World Health Organization, 1956.

56 Rice C M, Lenches E M, Eddy S R, et al. Nucleotide sequence of yellow fever virus: Implications for *Flavivirus* gene expression and evolution. Science, 1985, 229: 726-733.

57 Rice C M, Grakoui A, Galler R, et al. Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by *in vitro* ligation. The New Biologist, 1989, 1(3): 285-296.

58 Lai C J, Zhao B T, Hori H, et al. Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus. PNAS, 1991, 88(12): 5139-5143.

59 Sumiyoshi H, Hoke C H, Trent D W. Infectious Japanese encephalitis virus RNA can be synthesized from in vitro-ligated cDNA templates. Journal of Virology, 1992, 66(9): 5425-5431.

60 Khromykh A A, Westaway E G. Completion of Kunjin virus RNA sequence and recovery of an infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA. Journal of Virology, 1994, 68(7): 4580-4588.

61 Mandl C W, Ecker M, Holzmann H, et al. Infectious cDNA clones of tick-borne encephalitis virus European subtype prototypic strain Neudoerfl and high virulence strain Hypr. The Journal of General Virology, 1997, 78(5): 1049-1057.

62 Moormann R J, van Gennip H G, Miedema G K, et al. Infectious RNA transcribed from an engineered full-length cDNA template of the genome of a *Pestivirus*. Journal of Virology, 1996, 70(2): 763-770.

63 Meyers G, Thiel H J, Rümenapf T. Classical swine fever virus: Recovery of infectious viruses from cDNA constructs and generation of recombinant cytopathogenic defective interfering particles. Journal of Virology, 1996, 70(3): 1588-1595.

64 Ruggli N, Tratschin J D, Mittelholzer C, et al. Nucleotide sequence of classical swine fever virus strain Alfort/187 and transcription of infectious RNA from stably cloned full-length cDNA. Journal of Virology, 1996, 70(6): 3478-3487.

65 Meyers G, Tautz N, Becher P, et al. Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhea viruses from cDNA constructs. Journal of Virology, 1996, 70(12): 8606-8613.

66 Vassilev V B, Collett M S, Donis R O. Authentic and chimeric full-length genomic cDNA clones of bovine viral diarrhea virus that yield infectious transcripts. Journal of Virology, 1996, 70(12): 8606-8613.

67 Nair P. Profile of Charles M. Rice. PNAS, 2011, 108(21): 8541-8543.

68 Ohlinger V F, Haas B, Meyers G, et al. Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. Journal of Virology, 1990, 64(7): 3331-3336.

69 Emerson S U, Lewis M, Govindarajan S, et al. cDNA clone of hepatitis A virus encoding a virulent virus: Induction of viral hepatitis by direct nucleic acid transfection of marmosets. Journal of Virology, 1992, 66(11): 6649-6654.

70 Farci P, London W T, Wong D C, et al. The natural history of infection with hepatitis C virus (HCV) in chimpanzees: Comparison of serologic responses measured with first- and second- generation assays and relationship to HCV viremia. The Journal of Infectious Diseases, 1992, 165(6): 1006-1011.

71 Shindo M, di Bisceglie A M, Biswas R, et al. Hepatitis C virus replication during acute infection in the chimpanzee. Journal of Infectious Diseases, 1992, 166(2): 424-427.

72 Major M E, Mihalik K, Fernandez J, et al. Long-term follow-up of chimpanzees inoculated with the first infectious clone for hepatitis C virus. Journal of Virology, 1999, 73(4): 3317-3325.

73 Yanagi M, St Claire M, Shapiro M, et al. Transcripts of a chimeric cDNA clone of hepatitis C virus genotype 1b are infectious in vivo. Virology, 1998, 244(1): 161-172.

74 Yanagi M, Purcell R H, Emerson S U, et al. Hepatitis C virus: An infectious molecular clone of a second major genotype (2a) and lack of viability of intertypic 1a and 2a chimeras. Virology, 1999, 262(1): 250-263.

75 Gottwein J M, Scheel T K H, Callendret B, et al. Novel infectious cDNA clones of hepatitis C virus genotype 3a (strain S52) and 4a (strain ED43): Genetic analyses and in vivo pathogenesis studies. Journal of Virology, 2010, 84(10): 5277-5293.

76 The Nobel Assembly at Karolinska Institutet. Press release: The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2020. (2020-10-05)[2021-01-24]. https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2020/prize-announcement.

Not-So-Low-Hanging Fruit: Journey from Identifying HCV to Proving It Pathogen of Hepatitis C

FAN Xiaofei[1,2] ZHOU Cheng[1,2*]

（1 Department of Philosophy, Peking University, Beijing 100871, China;

2 School of Health Humanities, Peking University, Beijing 100191, China）

Abstract The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2020 was awarded jointly to Harvey J. Alter, Michael Houghton, and Charles M. Rice for their contributions in the discovery of hepatitis C virus (HCV). However, eight years lapsed between Houghton hunting down the virus in 1989 and Rice proving HCV alone could cause hepatitis in 1997. How did this seemingly low-hanging fruit turn out to take so long? We reviewed literature to piece together studies during those years, and determined contributions by different groups (Rice's group included). Through a close look into its performance at two milestones (determining the 3′-terminal sequence of HCV genome

*Corresponding author

RNA and constructing an infectious molecular clone), we analyzed, from dimensions of technology stack, path dependence, and goal setting, why Rice's group leapfrogged its competitive peers.

Keywords hepatitis C virus (HCV), cDNA clone, Koch's postulates, scientific research, the Nobel Prize, history of natural science



范筱斐 北京大学医学人文学院讲师，北京大学哲学系在读博士。主要研究领域：科学技术史、科学技术哲学。E-mail: fanxiaofei@bjmu.edu.cn

FAN Xiaofei Lecturer at School of Health Humanities, Peking University, and Ph.D. student at Department of Philosophy, Peking University. His research focuses on history of science and technology and philosophy of science and technology. E-mail: fanxiaofei@bjmu.edu.cn



周 程 北京大学哲学系教授、医学人文学院院长。国务院学位委员会科学技术史学科评议组成员。日本东京大学研究生院综合文化研究科交叉科学系（科学史与科学哲学研究室）博士。研究领域为科学社会史、科学技术与社会、创新管理与科技政策。代表性著作有《科技创新典型案例分析》《「科学」の中日源流考》等。E-mail: zhoucheng@pku.edu.cn

ZHOU Cheng Professor at Department of Philosophy and Dean of School of Health Humanities, Peking University. He received his Ph.D. at Department of Multi-Disciplinary Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, University of Tokyo. He is member of the Discipline Appraisal Group for History of Science and Technology at the Academic Degrees Committee of the State Council, China. His research focuses on social history of science, science, technology and society studies, innovation management, and science and technology policy. His major works include *Science, Technology and Innovation: Typical Case Study* and *A Study of the Origin of Science in China*. E-mail: zhoucheng@pku.edu.cn

■责任编辑：文彦杰